第27卷 第3期　　昆虫学报　　Vol. 27, No. 3
1984年8月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Aug., 1984

不同敌百虫抗性淡色库蚊幼虫中谷胱甘肽和谷胱甘肽转移酶的比较

姜家良　陈巧云　侯能俊　张朝远
（中国科学院上海昆虫研究所）

摘要　本文比较了三种不同敌百虫抗性淡色库蚊的谷胱甘肽和谷胱甘肽转移酶的活力。结果表明谷胱甘肽含量随着从幼虫、蛹、成虫的发育而逐渐增加，敌百虫抗性品系比敏感品系有明显高的谷胱甘肽转移酶的活力，同时敌百虫处理幼虫导致谷胱甘肽含量下降。推测敌百虫抗性可能同谷胱甘肽和谷胱甘肽转移酶活力增高有关。

关键词　淡色库蚊　谷胱甘肽　谷胱甘肽转移酶　敌百虫抗性

谷胱甘肽是生物体中许多酶反应的底物或辅酶，在细胞或器官中广泛分布，它同谷胱甘肽-S-转移酶一起是哺乳动物中重要解毒酶系，参与对许多化合物的代谢作用（Chasseaud, 1973），亦是昆虫对有机磷杀虫剂抗性的一个重要因子（Motovama 等，1972；1974），它对许多有机磷杀虫剂有降解作用（Fukami, 1980），其中包括对敌百虫的降解作用（Morello 等，1968）。为了阐明淡色库蚊对敌百虫的抗性机理，我们比较了不同敌百虫抗性水平的淡色库蚊中谷胱甘肽含量和谷胱甘肽-S-转移酶活力。现将结果报告如下。

材料与方法

（一）淡色库蚊品系　抗性I品系系本实验室用敌百虫选育而成，这品系对多种有机磷有交互抗性；抗性II品系系用苄呋菊酯选育而成，它对多种拟除虫菊酯有交互抗性；敏感品系为本试验室长期饲养的标准品系，幼虫的生物测定见以前报道（唐振华等，1980）。

（二）谷胱甘肽含量测定　参照 Bluter 等（1963）的方法。取淡色库蚊幼虫、蛹或成虫 0.02—0.04 克组织，在 6 毫升沉淀溶液中匀浆抽提，沉淀溶液组成为 1.67 克偏磷酸，0.2 克乙二胺四乙酸（EDTA）30 克氯化钠，溶于 100 毫升蒸馏水中。匀浆液在每分钟 3,500 转的转速下，离心 15 分钟，取适量上清液作谷胱甘肽测定。反应总体积为 3.5 毫升，其中加入 0.5 毫升 DTNB [5, 5′-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)]溶液（0.04% DTNB 在 pH7.5 的磷酸缓冲液中）。在 25℃ 412 毫微米测定光密度值，测定读数控制在 2 分钟内。每个测定组织样品均适置一个测定谷胱甘肽回收率的对照，即分别在各种组织中加入 100 微克标准谷胱甘肽，按上述方法匀浆抽提，然后同样测定光密度值。不同组织间的谷胱甘肽回收率在 95—102% 之间。谷胱甘肽量则从标准曲线查得。

（三）谷胱甘肽-S-转移酶测定

本文于 1983 年 2 月收到。
本文承龚坤元、刘维德两位先生审阅文稿；林国芳、徐徽同志帮助养虫，在此一并致谢。

酶源制备　取淡色库蚊四龄幼虫（167 毫克/毫升）在 66mM pH7.0 磷酸缓冲液中匀浆（内含 2mM EDTA），匀浆液在 3,500 转/分的转速下离心 15 分钟，上清液再在 26,000×g 离心 1 小时(4℃)，取上清液作酶源。

1. 谷胱甘肽-S-甲基转移酶活力测定，参照 Johnson（1966）的方法，利用碳[14]标记碘甲烷，在谷胱甘肽-S-甲基转移酶催化下生成不挥发的谷胱甘肽衍生物来测定。反应保温总体积为 6 毫升，其组成为：比活力为 0.7575mCi/mM $^{14}CH_3I$，稀释 100 倍后取 50 微升，1.2 毫升 10mM 谷胱甘肽，0.8 毫升 pH7.0 66mM 磷酸缓冲液(内含 2mMEDTA) 4毫升上述酶溶液。在 27℃ 保温，对照分别以磷酸缓冲液代替酶或谷胱甘肽，每隔 1 分钟吸取 0.5 毫升上述保温液于闪烁杯中，中止反应，杯中有 0.5 毫升 1% 溴甲醇液，反应结束后，将闪烁杯置于通风橱吹空气数小时或过夜，然后加入闪烁液计数测定，闪烁液组成为：PPO 7.0 克，POPOP 0.6 克，萘 75 克，乙二醇甲醚 400 毫升，甲苯加到 1000 毫升。

2. 谷胱甘肽-S-芳基转移酶测定参照 Oppenorth 等 1979 的方法。利用谷胱甘肽同 1-氯-2，4 二硝基苯反应生成共轭物而引起光密度的变化来测定。反应保温液组成为：30 微升 CDNB（1-氯-2，4二硝基苯）丙酮液（0.1M），0.3 毫升 50mM 谷胱甘肽，反应总体积为 3 毫升。以无酶反应作对照，利用带有恒温装置的岛津 UV-300 型双光束分光光度计测定 340 毫微米波长下光密度变化，所有测定在 3 分钟内呈线性，反应温度 25℃。

结 果 与 讨 论

谷胱甘肽是生物体中重要的辅基和底物，它不仅参与哺乳动物对许多化合物的解毒反应，而且参与杀虫剂对哺乳动物的选择毒性（Ioannou 等，1978）并在昆虫对杀虫剂抗性中起重要作用（Levis 等，1971；Motoyama 等，1972）(表 1)。

表 1　不同品系淡色库蚊在不同发育期谷胱甘肽含量

发育期 / 品系	四龄幼虫	蛹	成虫(羽化后三天)	
			♀	♂
敏　感	387.6±9.0	495±15.0	734.0±6.0	881.0±48.0
抗 性 I	487.5±22.0	648±22.0	460±25.0	610±60.0
抗 性 II	540±7.0	595.0±5.0	704.0±10.0	974.0±49.0

注　谷胱甘肽含量以微克/克组织湿重表示，三次以上测定的平均值±标准偏差。

从表 1 可见，不同淡色库蚊品系中或相同品系不同发育期中，它们的谷胱甘肽含量各不相同，但无论是抗性或是敏感品系，它们的谷胱甘肽含量均随着生长发育而增加，且淡色库蚊雄成虫的谷胱甘肽含量要比雌成虫高，这同 Saleh 等（1978）在家蝇中获得的结果相同。一般认为昆虫中谷胱甘肽含量不同，取决于营养、饲养条件下幼虫群体的密度以及不同生长期时取食的不同和激素平衡等多种因素。然而，谷胱甘肽的这种差异也可能反映了淡色库蚊不同发育阶段，如幼虫或成虫对需要谷胱甘肽参与而解毒的杀虫剂的毒性差异。这可以从表 1 中二个抗性品系(四龄幼虫)的谷胱甘肽均比相应敏感品系幼虫含量高中看出。并且抗性 II 品系谷胱甘肽含量＞抗性 I 品系＞敏感品系，这顺序同表 2 所列

表 2 不同品系淡色库蚊四龄幼虫对 DDT 和敌百虫抗性程度比较

杀虫剂 / 品系	DDT LC_{50}(ppm)	抗性倍数	敌百虫 LC_{50}(ppm)	抗性倍数
敏感	0.36	1.0	0.10	1.0
抗性 I	0.77	2.1	23.91	239.1
抗性 II	18.50	51.3	0.95	9.5

三个品系对 DDT 抗性大小一致。从表 2 可见抗性 II 品系对 DDT 抗性要比抗性 I 品系高 24 倍左右。现已知道 DDT 抗性的一个重要原因是由于 DDTase (DDT-脱氯化氢酶)的作用,而谷胱甘肽是 DDTase 所必需的辅基,并且起增强 DDTase 的稳定性作用(Fukami, 1980) 而利用专一性的 DDTase 抑制剂研究结果表明,抗性 II 品系中 DDT 抗性主要由于 DDTase 的作用。因此抗性 II 品系的谷胱甘肽增加可能同 DDT 抗性,尤其是 DDTase 的作用相关。但是由于谷胱甘肽是辅基,而不是反应底物,用不着大量内在的谷胱甘肽,所以尽管抗性 II 品系对 DDT 抗性比抗性 I 品系大得多,但谷胱甘肽含量差异不大。这种由于 DDT 抗性而导致谷胱甘肽含量增加的现象在抗 DDT 的家蝇和按蚊中也曾发现(Lipke 等, 1962) Whitehead (1961) 亦曾在抗砷化物的微小牛蜱中发现谷胱甘肽含量比敏感品系增加的现象。

谷胱甘肽不仅是 DDTase 的必须辅基,也是谷胱甘肽-S-转移酶的重要辅助因子,谷胱甘肽-S-转移酶是生物体中重要的代谢酶系,它能将多种有机磷杀虫剂的 O-烷基或芳基部分转移到谷胱甘肽上,形成共轭物而解毒 (Fukami, 1980)在哺乳动物中已发现谷胱甘肽本身就是有机磷解毒的重要因子 (Ioannou 等, 1978), Hollingworth (1969) 曾发现用 O, O 二甲基类有机磷杀虫剂处理能引起哺乳动物肝中的谷胱甘肽下降,表明肝中的谷胱甘肽含量变化同有机磷作用有关。为此我们用敌百虫 (O, O 二甲基类磷酸酯) 处理淡色库蚊幼虫,观察谷胱甘肽含量的变化。为了引起中毒效果,分别用三个品系各自的 LC_{50} (致死中浓度)及 10 倍 LC_{50} 量处理,二小时后测定谷胱甘肽含量(表 3)。

表 3 用敌百虫处理二小时后淡色库蚊四龄幼虫中谷胱甘肽含量变化*

处理 / 品系	未处理组谷胱甘肽含量	敌百虫处理后的谷胱甘肽含量	
		用各自 LC_{50} 量处理二小时	用各自 LC_{50} 值 10 倍处理二小时
敏感	387.6±9.0	392.0±3.0	386.0±4.1
抗性 I	487.5±22.0	475.0±18.0	374.0±19.5
抗性 II	540.0±7.0	481.0±27.0	489.0±5.0

* 谷胱甘肽含量系每克四龄幼虫中的微克数,三次测定平均值±标准偏差。

从表 3 可见若用 LC_{50} 量的敌百虫处理各品系,二小时后它们的谷胱甘肽含量未见变化;而在用 10 倍 LC_{50} 量时,在同样时间内抗性 I 品系谷胱甘肽有明显下降,但抗性 II 和敏感系则没有显著变化。这种谷胱甘肽下降现象同 Hollingworth (1969) 用杀螟硫磷处理鼠后,鼠肝中谷胱甘肽含量下降相似,但 Hollingworth 在鼠中未见到药剂处理后中毒症状

的出现(麻痹现象)和谷胱甘肽含量下降有相关性，而在淡色库蚊幼虫中，看来这种谷胱甘肽下降同中毒麻痹现象有关。因为无论敏感品系或抗性 II 品系在用 10 倍 LC_{50} 量处理二小时后，均未见到明显中毒现象，而在抗性 I 品系中则见到相当数量的幼虫呈中毒麻痹现象。已知谷胱甘肽含量下降会引起细胞损伤，并伴随细胞中酶活力丧失(Karl-Heinz Summer 等，1980)从而导致中毒麻痹现象出现。Morello 等(1968)曾提出敌百虫的降解是由于谷胱甘肽和谷胱甘肽-S-甲基转移酶的作用，因此推测这种谷胱甘肽下降现象可能是由于谷胱甘肽和敌百虫在谷胱甘肽-S-甲基转移酶作用下生成甲基谷胱甘肽共轭物的结果。谷胱甘肽参与有机磷解毒作用的情况 Inoannou 等(1978)曾作过有意义的报道，他们发现鼠和小鼠对乙嘧磷(也是一种 O，O 二甲基类有机磷杀虫剂)的解毒作用受谷胱甘肽含量限制，如果降低体内谷胱甘肽含量，将导致乙嘧磷对鼠和小鼠毒性增强；相反若增加谷胱甘肽含量，如静脉注射(Matsuda 等，1972)或同解毒剂混用(Kawai 等，1969)则能显著降低甲基对硫磷和 DDVP 对人和小鼠的毒性。

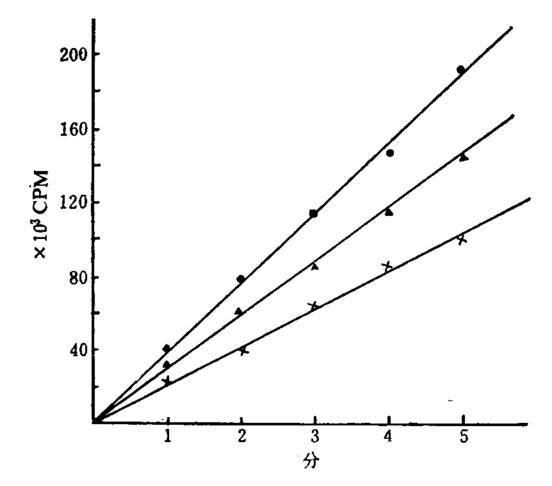


图 1　不同淡色库蚊中谷胱甘肽-S-甲基转移酶活力比较
×—×敏感品系　▲—▲抗性 I 品系　●—●抗性 II 品系。

为了进一步证实谷胱甘肽-S-甲基转移酶参与敌百虫的降解，我们比较了三个品系的谷胱甘肽-S-甲基转移酶和谷胱甘肽-S-芳基转移酶的活力见图 1、表 4。从图 1 和表 4 可见，虽然抗性 I 品系对敌百虫抗性要比抗性 II 大 25 倍左右(表 2)，但谷胱甘肽-S-甲基转移酶活力顺序却是抗性 II 品系＞抗性 I 品系＞敏感品系。这结果反映了抗性 I 和抗性 II 品系可能存在着不同的敌百虫抗性机理，但是无论是抗性 I 或抗性 II 品系，它们对敌百虫的抗性都有谷胱甘肽-S-甲基转移酶的参与，敌百虫抗性强的抗性 I 品系其谷胱甘肽-S-甲基转移酶活力不如抗性 II 品系，这意味着它不是抗性的唯一机理，这结果同抗性 I 品系的生物测定结果相符，即抗性 I 品系对敌百虫抗性是多因子的。这种由于谷胱甘肽-S-甲基转移酶使有机磷解毒的现象在一些抗有机磷的家蝇中亦有报道。(Motoyama 等，1975)

表 4　不同品系淡色库蚊中谷胱甘肽-S-甲基转移酶活力比较*

品　系	谷胱甘肽-S-甲基转移酶活力	相对速率
敏　感	3.54	1.0
抗　性　I	5.87	1.7
抗　性　II	7.15	2.0

* 酶活力系毫微克分子 $GS\text{-}CH_3$/分/0.17 克四龄幼虫。

值得指出的是(Motoyama 等，1975)在抗有机磷家蝇中发现同时存在着高的谷胱甘

表 5 不同品系淡色库蚊谷胱甘肽-S-芳基转移酶比较*

品系	光密度/分/0.017 克四龄幼虫 340 毫微米	相对活力
敏感	0.60±0.04	1.0
抗性 I	0.97±0.07	1.6
抗性 II	1.01±0.11	1.7

* 酶活力系在 340 毫微米波长时每 0.017 克四龄幼虫在每分钟时的光密度。结果系三次测定平均值±标准偏差。

肽-S-甲基转移酶和谷胱甘肽-S-芳基转移酶活力。从表 5 可见在敌百虫抗性淡色库蚊中亦有相同情况。抗性 I 和抗性 II 的谷胱甘肽-S-芳基转移酶活力相近，但分别是敏感品系的 1.6 倍和 1.7 倍。在家蝇中 Motoyama 等(1975)曾证实谷胱甘肽-S-甲基转移酶和谷胱甘肽-S-芳基转移酶是由同一个基因控制的相同的酶，只是催化不同底物的结果。这种既能同 O-烷基又能和 O-芳基共轭反应的特性，在纯化的鼠肝(Usui, K., T. Shishido 等，1977)和美洲蜚蠊脂肪体的谷胱甘肽-S-转移酶（Usui, K., J. Fukami 等，1977）中也曾发现。在我们的淡色库蚊中，由于使用的是粗匀浆制剂，因此不能完全排除这二个酶可能有定性差别。但从比较这二个酶和敏感品系的相对活力来看，抗性 I 和抗性 II 品系这二个酶活力同敏感品系比值接近，因此也有可能同家蝇中相似，是由同一个基因控制的催化不同底物的同一个酶，这将有待于进一步将酶纯化来证实。

参 考 文 献

唐振华等 1980 淡色库蚊对敌百虫的抗药性研究——抗性谱及联合作用。昆虫学报 **23**(3):276—85。

Bluter, E., Olga Duron and Barbara Mikus Kelly. 1963 Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Chemical Medicine* **61**: 852—88.

Chasseaud, L. F. 1973 The nature and distribution of enzymes catalysing the conjugation of glutathione with foreigh compounds. *Drug Metabol Rev.* 2: 185—94.

Jun-ichi Fukami. 1980 Metabolism of several insecticides by glutathione-S-transferase. *Pharmac. Ther.* **10**: 473—514.

Hollingworth, R. M. 1963 Dealkylation of organophosphorus esters by mouse liver enzymes in vitro and in vivo. *J. Agr. Food. Chem.* **17**: 987—96.

Ioannou, Y. M. and W. C. Dauterman 1978 In vitro metabolism of etrimfos by rat and mouse liver. *Pestic. Biochem. Physiol.* **9**: 190—5.

Johnson, M. K. 1966 Studies on glutathione-S-alkyltransferase of the rat. *Biochem. J.* **98**: 44—56.

Kawai, M. and Ueda, K. 1969 Therapy of organorphosphate poisoning with eximeantidote and glutathion. 4th International Congress on Rural Medicine, Usuda, Abstract of papers p. 10.

Levis, J. B. and R. M. Sawicki 1971 Characterization of the resistance mechanisms to diazinon, parathion, and diazoxon in organophosphorus-resistant SKA strain of housefly (*Musca domestica* L.) *Pestic. Biochem. Physiol.* **1**: 275—85.

Lipke, H. and Chalkley, J. 1962 Glutathione oxidized and reduced in some dipterans treated with 1, 1, 1,-trichloro-2, 2-di (p-chlorophenyl) ethane. *Biochem J.* **85**: 104—9.

Matsuda, S., Mikami, M., Ohtahi, Y. and Kude, N. 1972 Interrelation between blood glutathione and cholinesterase activity in methyl parathion poisoning. *Seikagaku.* **44**: 209—302.

Morello, A., A. Vardames and E. Y. Spencer 1968 Mechanism of detoxication of some organophosphorus compounds: the role of glutathione-dependent demethylation. *Can. Biochem.* **46**: 885—92.

Motoyama, N. and W. C. Dauterman 1974 The role of non-oxidative metabolism in organophosphorus resistance. *J. Agr. Food Chem.* **22**: 350—5.

Motoyama, N. and W. C. Dauterman 1975 Interstrain comparison of glutathione-dependent reactions in susceptible and resistant houseflies. *Pestic. Biochem. Physiol.* **5**: 489—95.

Motoyama, N. and W. C. Dauterman 1972 In vitro metabolism of azinphosmethyl in susceptible and resistant houseflies. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2**: 113—22.

Oppenoorth, F. J., L. J. R. Van der Pas and N. W. H. Houx 1979 Glutathione-S-transferase and hydro. lytic cativity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* **11**: 176—88.

Summer Karl-Heinz and Waltraud Goggelmann 1980 1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene deletes glutathione in rat skin and is mutagenic in *Salmonella typhimunum*. *Mutation Research* **77**: 91—3.

Usui, K., J. Fukami and T. Shishido 1977 Insect glutathione S-transferase: separation of transferase from fat bodies of American cockroaches active on organophosphorus triesters. *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**: 246—60.

Usui, K., T. Shishido and J. Fukami 1977 Glutathione-S-transferase of rat liver active on organophosphorus triesters. *Agr. Biol. Chem.* **41**: 2491—8.

Whitehead, G. B. 1961 Investigation of the mechanism of resistance to sodium arsenite in blue tick *Boophilus decoloratus* Koch. *J. Insect Physiol.* **7**: 177—85.

COMPARISON OF GSH AND GSH-S-TRANSFERASE IN SUSCEPTIBLE AND DIPTEREX-RESISTANT *CULEX PIPIENS PALLENS* COQ.

JIANG JIA-LIANG　CHEN QIAO-YUN,　HOU NENG-JUN　ZHANG ZHAO-YUAN

(Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica)

The amount of glutathione present at various developmental stages of three strains of the mosquito *Cutex pipiens pallens* was determined. A gradually increase in glutathione was found through the larval, pupal and adult stages. A significant decrease in glutathione after treating with dipterex and high glutathione levels along with high transferase activities in the two resistant strains were observed. The results suggest glutathione and glutathione-S-transferase may play an important role in the dipterex resistance in this mosquito.

Key words *Culex pipiens pallens*——glutathione——glutathion-s-transferase——dipte-rex-resistance